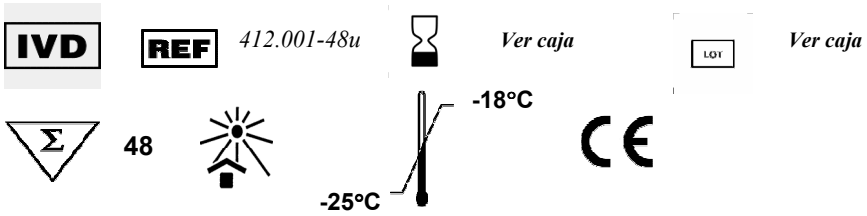
Modo de empleo

ChromoQuant® Kit QF-PCR[1] de diagnóstico in vitro ChromoQuant® para el análisis de alteraciones cromosómicas comunes en los cromosomas 13, 18 y 21.



Precauciones

Para utilizarse con secuenciadores fluorescentes compatibles con el grupo de filtros D en los analizadores genéticos ABI PRISM® 3100, 310, y 3130 - de Applied Biosystems y el grupo de filtros 2 en MegaBACE™ 500/1000 de Amersham Biosciences. Asegúrese de que su secuenciador sea compatible con los fluorocromos 6-FAM, HEX y NED.

Se recomienda utilizar este kit con ADN purificado procedente de líquido amniótico, algodones bucales, saliva o sangre. ¡La función del kit no se puede garantizar si no se utiliza la Taq polimerasa recomendada!

¡La Taq polimerasa NO se incluye en el kit!

Para obtener resultados de calidad, utilice siempre > 15 ng - < 150 ng de ADN por muestra de PCR.

Para lograr resultados de PCR óptimos, siga las instrucciones proporcionadas para el instrumento PCR disponible. Los tapones de PCR rotos deben sustituirse antes de llevarse a amplificación por PCR.

Las muestras de los pacientes que estén manchadas de sangre no deben analizarse con este kit, por ejemplo, cuando se utiliza ADN procedente del líquido amniótico.

Para evitar la contaminación cruzada durante la configuración de PCR, asegúrese de usar una nueva punta de pipeta para cada pozo que deba llenar con ADN.

La sal interferirá con la separación de fragmentos durante la electroforesis en gel. Se recomienda desalar después de PCR.

La calidad de la formamida o del agua añadidas a la muestra de ADN antes de la carga o de la inyección electrocinética afectará la sensibilidad. Asegúrese que sean siempre de la máxima calidad.

Los reactivos para purificar el ADN genómico no se incluyen en el kit.

[1] *El proceso de PCR está cubierto por las patentes de EE.UU. 4.683.195 y 4.683.202 y equivalentes extranjeros propiedad de Hoffman-La Roche AB. El usuario debe tener una licencia de Hoffman-La Roche para utilizar la tecnología PCR.*

Composición del kit

- Seis tiras de ocho tubos.

Cada tubo PCR contiene una mezcla de cebadores lista para usar.

- Tapones de tiras de PCR.
- Un tampón de dilución de enzima: 300 µl en un tubo con tapón de rosca (blanco), (tampón Tris, EDTA)
- Un tampón QF-PCR: 1,5 ml en un tubo con tapón de rosca (amarillo) ($MgCl_2$, $(NH_4SO_4)_2$, dNTP, β-mercaptoetanol, albúmina de suero bovino).

Instrucciones de almacenamiento y conservación después de la apertura inicial

- Guarde los tubos PCR de mezcla de cebadores sin usar y el tampón QF-PCR en un lugar oscuro y a < -18° C. El tampón de dilución de enzima se puede guardar a una temperatura de -20 a +8°C. Es recomendable guardar siempre el material que no se utilice en la bolsa de aluminio precintable original.
- Utilice papel de aluminio cuando sea necesario para proteger los tubos de una exposición innecesaria a la luz, por ejemplo, al trabajar con el kit en la mesa del laboratorio antes de PCR.
- Periodo de validez: Ver fecha de caducidad.

Reactivos especiales adicionales que debe aportar el usuario

- *Taq polimerasa HotStar Taq*, Qiagen; nº de producto *#203203, 250U* [5 U μl^{-1}
- Electroforesis en gel fluorescente tamaño estándar, por ejemplo ABI GeneScan®-500 [ROX]™ número de producto 401734 o ET-ROX número de producto 5-6550-01 de Amersham Biosciences:Esto se añade a la muestra de ADN después de PCR pero antes de la electroforesis en gel.
- Columnas para desalar el producto de PCR antes de la electroforesis capilar en gel.

Otros reactivos para purificar el ADN genómico.

Procedimiento

Preparación y purificación del ADN

Los reactivos para purificar el ADN procedente de tejido humano NO están incluidos en el kit. Es recomendable utilizar tecnologías de preparación de ADN comerciales que proporcionen un ADN genómico puro.

Independientemente del método de preparación, diluya el ADN para obtener una concentración final de 1,5-15 ng/µl utilizando agua estéril.

Amplificación por PCR multiplex de ADN genómico

1. Descongele el tampón de QF-PCR y el tampón de dilución de enzima a temperatura ambiente y colóquelos en hielo.
2. Determine el número total de tubos PCR, es decir (N).
3. Mézclelo en un microtubo de polipropileno separado (un tubo Eppendorf de 1,5 ml, por ejemplo).
    - Tampón de dilución de enzima 1,6 µl, Taq polimerasa 0,4 µl y tampón QF-PCR 13 µl multiplicados por N. Prepare siempre un poco de cantidad extra.

Los tubos PCR suministrados con el kit están dispuestos en tiras de ocho. Las tiras analizarán ocho muestras de pacientes cada una.

Para obtener mejores resultados, se recomienda trabajar rápido en hielo.

4. Añada 15 µl de la mezcla maestra del paso 3 a cada tubo PCR.
5. Añada 10 µl de muestra de ADN (15-150 ng). Mézclelo mediante bombeo por pipeta cinco veces. Volumen final 25 µl.
6. Golpee suavemente los tubos de la tira contra la mesa del laboratorio o gírelos en una microcentrífuga para asegurarse de que todos los reactivos se acumulen en la parte inferior del tubo PCR.

7. Realice la amplificación por PCR de inmediato.

Protocolo de PCR

Los pasos 2-4 se repiten 26 ciclos.

Paso	Nº de ciclos	Temp.	Tiempo
1 **HotStarTaq**	1	95oC	15 Min.
2	Repetición 26	94oC	30 S
3	"	57oC	1 Min.
4	"	71oC	2 Min.
5	1	71oC	5 Min.
6	1	60oC	1 H
7	Aguantar	4 oC	∞

Electroforesis en gel de fragmentos de ADN amplificados

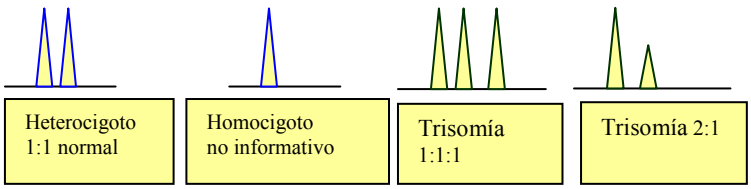
Desale cada muestra de PCR de forma individual antes de la inyección electrocinética en los capilares.

Realice la electroforesis en gel de acuerdo con el manual del instrumento o la buena práctica en el laboratorio para obtener la mejor resolución de fragmentos entre 135 – 500 nucleótidos.

Limitaciones del método y características de rendimiento

La información del marcador de cada cromosoma es cuatro veces redundante (cromosoma 13, 18 y 21). Un resultado analítico en el que dos de los marcadores de un cromosoma particular sean informativos debe considerarse un éxito y se puede utilizar como indicación diagnóstica.

Este kit no está pensado para evaluar o determinar si se ha producido alguna translocación que afecte a los cromosomas 13, 18, 21.. No obstante, se puede evaluar un estado trisómico a nivel cromosómico. Este kit no debe utilizarse para evaluar aberraciones genéticas mosaico (por ejemplo, la lionización).

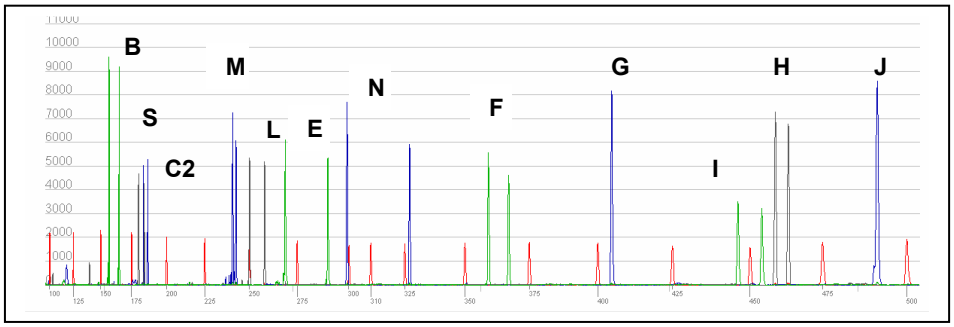


El índice pico normal dentro de una STR es 0,8-1,4. El índice pico de trisomía es <0,65 y >1,8. Área o altura del alelo corto dividida por área o altura del alelo largo. Los índices de alelo comprendidos entre los límites normales y anormales se clasifican como no concluyentes y deben analizarse de nuevo. Si en un solo cromosoma se obtienen patrones de alelos tanto anormales como normales, no es aceptable interpretar los resultados finales como normales o anormales. Deben llevarse a cabo estudios de seguimiento.

Para obtener información detallada sobre la interpretación de los resultados, consulte el manual del usuario de ChromoQuant. El manual del usuario se puede descargar del sitio web de ChromoQuant o solicitarlo directamente a CyberGene AB. Nº de producto: 901.115-00.

ChromoQuant 412.001-48

Marcador	Ubicación	Cromosoma	STR	Tamaño bp	Color
E	13q12.13	13	230-326	Verde	HEX
G	13q21.33	13	380-445	Azul	6-FAM
H	13q31.1	13	420-475	Amarillo	NED
I	13q13.3	13	425-470	Verde	HEX
B	18p11.31	18	135-185	Verde	HEX
C2	18p11.31	18	171-201	Azul	6-FAM
F	18q22.1	18	330-405	Verde	HEX
J	18q12.3	18	450-505	Azul	6-FAM
L	21q21.1	21	220-285	Amarillo	NED
N	21q22.2	21	282-336	Azul	6-FAM
M	21q22.13	21	226-267	Azul	6-FAM
S	21q21.3	21	150-210	Amarillo	NED



CyberGene AB, Box 30057, 104 25
Estocholmo, Suecia